

На правах рукописи



АЛФРЕДО ЭЛДЕР

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ *Mycobacterium tuberculosis* И
ВЫЯВЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫХ ИЗ НИХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА

03.02.03 – Микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета и в лаборатории молекулярно – биологических исследований «Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ»

Научные руководители: кандидат биологических наук,
Уразов Наиль Гумерович
кандидат биологических наук,
доцент **Вершинина Валентина Ивановна**

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Рауис Госманович
профессор кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии ФГОУ ВПО
«Казанская государственная академия
ветеринарной медицины»

доктор биологических наук,
Коксин Владимир Петрович
заведующий лабораторий биохимии ГАУЗ
«Республиканский центр по профилактике и
борьбе со СПИД и инфекционными
заболеваниями МЗ РТ»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр токсикологической радиационной и биологической безопасности» (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») г Казань

Защита состоится «25» апреля 2013 г в 13 часов на заседании диссертационного Совета Д 212.081.08. при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание ауд. 211

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

Автореферат разослан «18» марта 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета Д 212.081.08

д.б.н., профессор



З.И.Абрамова

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Туберкулез представляет собой важную медицинскую и социально-экономическую проблему во всем мире. Анализ сложившейся эпидемиологической ситуации показывает, что заболеваемость туберкулезом в России носит характер эпидемии [Карпов, 1998; Пунга, 1999; Онищенко, 2002]. По данным ВОЗ в период с 2000 по 2020 гг. туберкулезом в мире заболеет около 200 млн. человек, умрет около 35 млн. человек, будут инфицированы приблизительно 1 млрд. человек [World Health Organization, 2009]. В связи с этим, одной из важных задач мировой медицины является разработка надежных (эффективных и специфических), простых в использовании, методов для быстрой диагностики туберкулеза.

Важную проблему в настоящее время представляет сам возбудитель заболевания, в части носит его способность к выживанию в среде обитания и все увеличивающееся число устойчивых к противотуберкулезным препаратам первого ряда (стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу) форм, в том числе одновременно к нескольким (поли- и мультирезистентных), особенно у впервые заболевших [Dwyer *et al*, 1993; Díaz-Infantes *et al*, 2000]. Микробиологические исследования играют в современных условиях важную роль в выявлении, диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза, выборе лечения, оценке его эффективности.

Следует отметить, что из-за многообразия форм туберкулеза диагностика этой болезни весьма сложна. Обязательный диагностический минимум включает обследование с использованием клинических анализов крови и мочи, физикальных, рентгенологических, микроскопических и бактериологических, а также иммунологических методов.

До недавнего времени наиболее чувствительными и широко применяемыми методами для выявления антител к *Mycobacterium tuberculosis* являлись реакции пассивной гемагглютинации, агрегатагглютинации, связывания комплемента. В настоящее время используются для постановки диагноза более чувствительные

серологические методы такие, как иммунофлуоресценция, радиоиммунный и иммуноферментный анализы (ИФА). Фактически серологические методы наиболее удобны для клинической и эпидемиологической работы по диагностике туберкулеза, так как для анализа используется легко доступный клинический материал – сыворотка или плазма крови человека. Однако эти методы, включая метод ИФА, не обладают достаточной диагностической чувствительностью.

При использовании в недавнем прошлом антигенных препаратов у лиц с установленным диагнозом туберкулез противотуберкулезные антитела (ПТАТ) обнаруживаются в 100% случаях только при фиброзно-кавернозном туберкулезе и при бактериовыделении [Карпов, 1998]. Однако больные с фиброзно-кавернозной формой туберкулеза составляют небольшую часть от общего количества больных туберкулезом. При очаговом туберкулезе ПТАТ обнаруживают только в 31% случаев, а при туберкулезе бронхов – в 15,5% случаев [Карпов, 1998]. В более поздних публикациях также отмечается не очень высокий процент выявляемости ПТАТ, в среднем в 71% случаев [Чуканов и Слогодская, 2007].

При применении отдельных рекомбинантных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, выявляемость ПТАТ в сыворотках больных туберкулезом, за исключением ВИЧ инфицированных пациентов, также невысока – около 60% [Mukherjee *et al*, 2004]. Есть данные, что использование набора значительного количества рекомбинантных антигенов приводило к улучшению результата: ПТАТ выявляли у 93% больных туберкулезом [Houghton *et al*, 2002; Wang *et al*, 2005]. Но, поскольку не ясно, у пациентов с какой формой туберкулеза обнаруживали такой высокий процент ПТАТ, трудно оценить диагностическую ценность предложенного набора антигенов.

В последние годы стало возможным применение метода полимеразной цепной реакции для диагностики туберкулеза, но из-за высокой стоимости анализа этот метод пока не получил широкого распространения. А если принять во внимание количество носителей палочки Коха в мире, и что большая часть их проживает в бедных и слаборазвитых странах, то вряд ли

метод ПЦР будет приемлем в ближайшее время для скрининговых исследований.

Особо остро проблема туберкулеза встала с возникновением и распространением ВИЧ-инфекции. На фоне этого заболевания туберкулез развивается очень стремительно. Используемые в настоящее время скрининговые тест-системы, в связи с недостаточной чувствительностью, не позволяют своевременно выявить развитие этого заболевания. Поэтому работы по совершенствованию тест-систем, основанных на серологических реакциях, являются актуальными.

Цель исследования – разработка способа получения антигенных препаратов *Mycobacterium tuberculosis* и изучение их серологической активности в ИФА и иммуноблотинге.

Задачи работы:

1. Выявление антигенов *Mycobacterium tuberculosis* в фильтрате культурального супернатанта.
2. Определение целесообразности использования этанола для повышения активности и специфичности антигенов из супернатанта *Mycobacterium tuberculosis*, предназначенных для использования в ИФА и иммуноблотинге.
3. Определение возможности повышения специфичности антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, содержащихся в супернатанте, с использованием метода ультрацентрифугирования
4. Определение особенностей антигенных спектров различных видов микобактерий.
5. Установление возможности использования комплексов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из клеток с помощью экстракции 10% раствором ДМСО, для получения индивидуальных специфичных антигенов, пригодных для использования в реакции иммуноблотинга.

Научная новизна

Выявлены особенности антигенного профиля *Mycobacterium tuberculosis* шт. «Академия». Среди секретируемых белков серологическую активность проявляли доминирующий белок с молекулярной массой 38 кДа и белки 31 кДа, 29 кДа и 6,5 кДа. Белок с молекулярной массой 45 кДа присутствует в значительных количествах в спектрах белков *Mycobacterium tuberculosis*, *M. intracellulare* и *M. avium* и практически не выявляется у *M. bovis* и вакцинного штамма БЦЖ. Это позволяет использовать данный антиген в качестве компонента тест-системы, выявляющей противотуберкулезные антитела в сыворотке крови людей, инфицированных патогенными микобактериями, а также исключить из круга подозреваемых лиц, вакцинированных БЦЖ.

Практическая ценность

Разработаны методы получения растворимых антигенных комплексов *Mycobacterium tuberculosis* из супернатанта (белки с молекулярными массами 38кДа, 31 кДа, 29кДа, 6,5кДа) и клеточного антигена (белок с м.м. 45кДа). Определены приемы, позволяющие сохранить большую часть диагностически значимого антигенного материала и освободиться от значительной части балластных белков. Антигены *M. tuberculosis* 45 кДа, 38 кДа, 31 кДа, 29кДа и 6,5 кДа планируется использовать в разрабатываемой на основе метода иммуноблотинга тест-системе, необходимой практическому здравоохранению для эффективной диагностики туберкулеза

Положения, выносимые на защиту

1) При культивировании в среде Сотона в течение 14-28 суток *Mycobacterium tuberculosis* штамма «Академия» в фильтрате супернатанта обнаруживаются белки с молекулярными массами 38 кДа, 31 кДа, 29кДа и 6,5 кДа.

2) Осаждение этанолом фильтрата культурального супернатанта *Mycobacterium tuberculosis* приводит к повышению активности антигенсодержащего материала и позволяет избавиться от значительного количества балластных, не реагирующих с противотуберкулезными антителами белков.

3) Метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы позволяет выделить из супернатанта *Mycobacterium tuberculosis* материал с более высоким содержанием специфических антигенов.

4) Классические приемы очистки белков, такие как осаждение при определенных значениях pH, фракционирование этанолом и сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией, позволяют получить из ДМСО-экстракта *M. tuberculosis* антигенный препарат, содержащий практически одну серопозитивную фракцию с молекулярной массой в 45 кДа.

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены на Итоговых научных конференциях КФУ (Казань 2011, 2012), XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2012», (Москва, 2012), III международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2012), III Международной интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнология» (Казань, 2012).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 98 страницах текста и содержит 5 графиков и 14 рисунков (электрофореграммы, денситограммы, иммуноблоты).

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета и в лаборатории молекулярно – биологических исследований ГАУЗ «Республиканской центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ».

Материалы и методы

Исследования проводились с микобактериями: *Micobacterium tuberculosis*, штамм «Академия», *Micobacterium bovis*, *Micobacterium intracellulari*, *Micobacterium avium*, полученными из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва).

Фракционирование белков, содержащихся в фильтрате культурального супернатанта, проводили в ступенчатом градиенте сахарозы на ультрацентрифуге «BECMAN L7-80».

Определение специфических противотуберкулезных антител (ПТАТ) к антигенам *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в сыворотке крови больных проводили стандартным методом ИФА, согласно инструкции к тест-системе «АТ-Туб-Бест». Учет результатов проводили при длине волны 450 нм на 96-лучевом спектрофотометре «MULTISKAN EX».

Диск-электрофорез выполняли в пластинчатом 12,5% и 15% полиакриламидном гелях (по Laemmli)

Для окрашивания белков, фракционированных в ПАГ, использовали 0,04% кумаси G-250 в 3,5% растворе хлорной кислоты. В случае недостаточной плотности окрашенных зон, проводили дополнительное окрашивание с помощью AgNO_3 .

Определение молекулярных масс антигенов выполняли электрофоретическим методом [K. Weber и M. Osborn, 1969], используя набор белков «Prestained SDS-PAGE Standarts High Range» (BIO-RAD).

Электроперенос белков, фракционированных в ПАГ, на нитроцеллюлозную мембрану проводили на аппарате «NRANS-BLON SD» (BIO-RAD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление секретируемых антигенов *Mycobacterium tuberculosis*

Одним из ключевых препаратов иммуноферментной тест-системы, предназначенной для выявления специфических антител, является антиген. Именно его качеством во многом определяется чувствительность и специфичность конкретной тест-системы.

Целью описанной ниже серии экспериментов было определение возможности использования фильтрата культурального супернатанта в качестве источника антигенов

Культуру *M. tuberculosis* штамм «Академия», выращивали на среде Левенштейна–Йенсена, а затем – на среде Сотона. После отделения бактериальной массы центрифугированием, полученный супернатант фильтровали через мембранные фильтры «Millipore» (размер пор 0,65 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм). Полученный фильтрат культурального супернатанта (ФКС) использовали как исходный материал для дальнейших экспериментов.

Белковый спектр ФКС был исследован методом электрофореза, а серологическая активность полученных фракций – методом иммуноблотинга. При постановке иммуноблотинга использовали сыворотки условно здоровых людей и сыворотки пациентов с установленным диагнозом туберкулез.

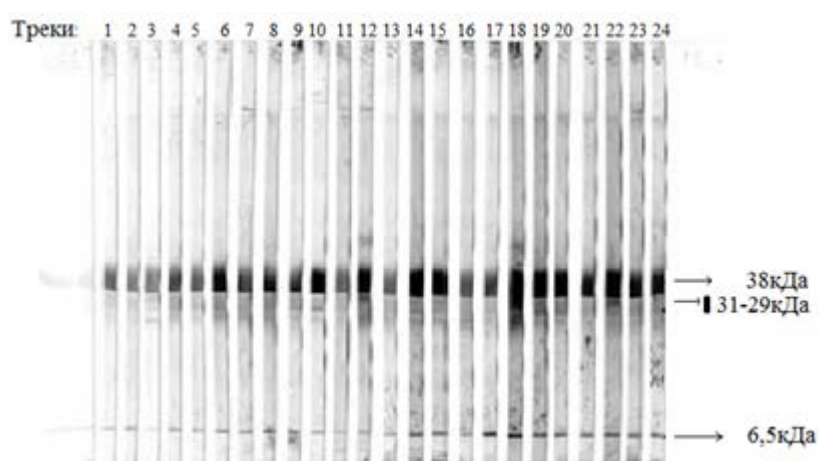


Рис.1. Иммуноблоты. Треки: 1–17 с сыворотками условно здоровых пациентов; 18–19 – с сыворотками пациентов с сочетанной ВИЧ/туберкулезной инфекцией; 20–24 с сыворотками больных туберкулезом.

Из рисунка 1 видно, что различий между иммуноблотами, полученными с сыворотками больных туберкулезом и сыворотками здоровых пациентов, практически нет. При этом наибольшую серопозитивность проявляет фракция с молекулярной массой 38 кДа и меньшую – 6,5 кДа. Третья фракция с м.м. 29-31 кДа, хорошо представленная на

электрофореграмме (показано ниже), проявляет слабую серопозитивность со всеми исследуемыми сыворотками.

Выделение антигенных комплексов *Mycobacterium tuberculosis* из фильтрата культурального супернатанта с помощью этанола

Полагая, что присутствующие в ФКС метаболиты, возможные продукты разрушившихся клеток и иные низкомолекулярные соединения могут конкурировать с антигенами при сорбции на полистероловом планшете, было проведено осаждение белков из ФКС этанолом.

Процедуру осаждения проводили следующим образом: к ФКС приливали равный объем охлажденного до -20°C этанола и выдерживали 15 минут при температуре -20°C . Осадок отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут. К полученному супернатанту добавляли еще один, равный первоначальному, объем этанола и повторно отделяли осадок. Дальнейшее добавление органического растворителя не приводило к агрегации белков и образованию осадка.

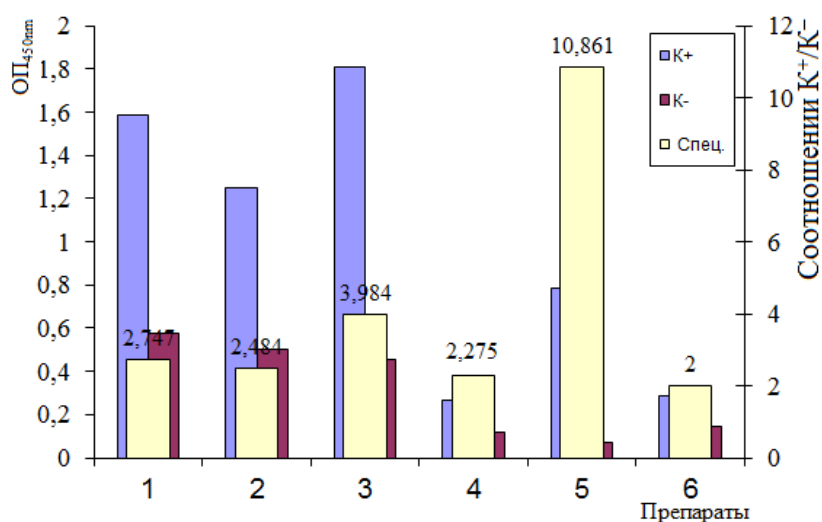


Рис. 2. Показатели ОП в ИФА с антигенными препаратами, выделенными из ФКС с использованием этанола. Для сенсibilизации планшетов использовали образцы с концентрацией белка 3,75 мкг/мл. Препараты: 1) исходный ФКС; 2) спонтанный осадок; 3) осадок, полученный после добавления к ФКС равного объема этанола; 4) осадок, полученный после повторного добавления к ФКС еще одного объема этанола; 5) супернатант без диализа; 6) супернатант после диализа.

Полученные осадки, а также 2 варианта концентрированного в 20 раз супернатанта, были исследованы в ИФА. Иммуобилизацию антигенсодержащих материалов в лунках полистеролового планшета проводили при комнатной температуре в течение 18-20 часов в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,2-7,4. ИФА проводили с положительной и отрицательной сыворотками, разведенными 1:100.

На рисунке 2 представлен анализ результатов ИФА антигенных препаратов: исходного ФКС, спонтанно выпавшего осадка, двух этанольных осадков и двух вариантов супернатанта. Видно, что наиболее высокий показатель ОП имеет антигенный препарат, представляющий осадок, полученный при добавлении ФКС одного объема этанола, тогда как наименьшие показатели имели второй этанольный осадок и супернатант, который диализировали против дистиллированной воды.

Обращает внимание высокий коэффициент специфичности пробы № 5, представляющей собой супернатант после освобождения от этанола в процессе концентрирования пробы. Предположительно в этом супернатанте присутствуют специфические низкомолекулярные антигены или фрагменты антигенов, которые были потеряны при диализе против дистиллированной воды и последующей концентрации (проба №6).

Все исследованные в ИФА препараты были подвергнуты электрофоретическому разделению в 12,5% ПАГ. Определение молекулярных масс антигенов проводили с использованием набора стандартных белков «Prestained SDS-PAGE Standarts High Range» (BIO-RAD). Белковые фракции, локализованные в ПАГ, выявляли с помощью красителя кумаси G-250. Определение антигенной активности электрофоретических фракций проводили методом иммуноблотинга с использованием положительной и отрицательной сывороток из диагностического набора «АТ-Туб-Бест» производства «Вектор-Бест», а также с сыворотками, полученными от пациентов с установленным диагнозом туберкулез.

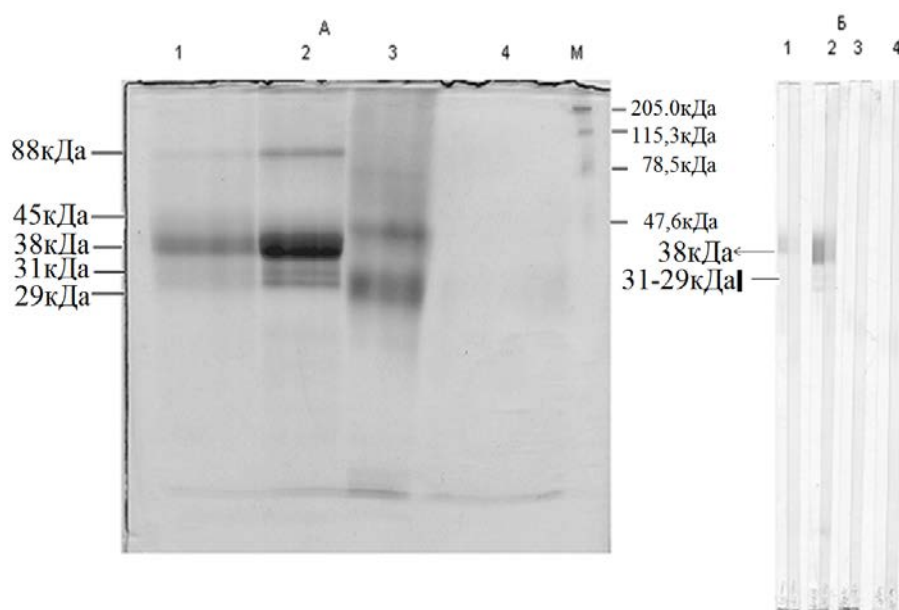


Рис. 3. Спектр белков в фильтрате культурального супернатанта *M. tuberculosis*.

А) Гель, с которого был проведен электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Треки: 1) исходный ФКС; 2) осадок, полученный после добавления к ФКС равного объема этанола; 3) осадок, полученный после повторного добавления к ФКС еще одного объема этанола; 4) супернатант, диализированный против дистиллированной воды. Фракционирование проводили в 12,5% ПАГ. Белковые фракции окрашены красителем Кумаси G-250.

Б) Иммуноблоты, полученные с антигенами № 1, 2, 3 и 4. Сыворотки: слева положительная, справа – отрицательная.

На рисунке 3 представлены последовательно гель с фракционированными в нем 4 антигенными препаратами, которые были перенесены на НЦМ, и 4 пары иммуноблотов, соответственно количеству фракционированных препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в исходном ФКС основная доля белка приходится на белок с м. м. 38 кДа; несколько меньшую долю составляют белки с м. м. 88 кДа, 31 кДа, 29 кДа и 6,5 кДа.

Электрофореграмма 1-го этанольного осадка имеет практически тот же набор белковых фракций, который присутствует на электрофореграмме исходного ФКС, но они проявляются значительно более четко.

Спектр белков 2-го этанольного осадка (рис.3, трек 3) достаточно сильно отличается от спектров белков исходного ФКС и 1-го этанольного

осадка. Привлекает внимание тот факт, что в нем практически отсутствует фракция с м.м. 38 кДа, которая по данным многих исследователей представляет антиген, имеющий важное значения для диагностики туберкулеза. Это дает основание полагать, что при осаждении белков ФКС равным объемом этанола этот антиген сохраняется практически полностью.

Результаты иммуноблотинга, которые представлены на рис 3Б, свидетельствуют о том, что серологически наиболее активным является белок с молекулярной массой 38 кДа. Заметно уступают ему по активности белки с молекулярными массами 31-29 кДа.

На иммуноблотах с материалом 2-го этанольного осадка и супернатанта окрашенных зон не обнаруживается. В случае с супернатантом, это легко объясняется небольшим содержанием в нем белковых фракций. Однако 2-ой этанольный осадок по количеству белка мало отличался от 1-го этанольного осадка.

Следует отметить, что полученный нами спектр белков ФКС очень сильно отличался от спектра белков культурального супернатанта, демонстрируемого в работе [Verbon. *at al.*, 1990]. На электрофореграмме, полученной авторами в фильтрате *M. tuberculosis* шт. H37Rv практически отсутствовали фракции с м.м. 38 кДа, 31 кДа, 29 кДа. На наш взгляд, данный факт свидетельствует о своеобразии спектра секретируемых белков у разных штаммов *M. tuberculosis* и указывает на необходимость проведения аналогичного исследования при работе с другими штаммами этого инфекционного агента.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют, что при добавлении к ФКС равного объема этанола в образовавшемся осадке содержится основное количество серологически активного материала. Повторное добавление этанола приводит к образованию осадка, в котором содержание серологически активного материала незначительно. На наш взгляд представляет интерес и материал супернатанта,

так как по данным ИФА в нем находятся антигены, проявляющие более высокую специфичность, чем специфичность исходного ФКС.

Выделение антигенных комплексов *Mycobacterium tuberculosis* из фильтрата культурального супернатанта методом ультрацентрифугирования

Ультрацентрифугирование широко используется при очистке белков, так как позволяет быстро разделять материалы, обладающие различной плотностью, даже если эти различия весьма небольшие.

В следующей серии экспериментов нами было проведено фракционирование исходного ФКС методом ультрацентрифугирования, которое проводили в ступенчатом градиенте сахарозы: 7,5%, 15%, 30%, 60%. Сахарозу готовили на 0,05 М Трис-НСl буфере, рН 6,8. Отбор материала из центрифужных пробирок проводили шприцом, последовательно отбирая фракции из верхней части пробирок. Всего было получено 9 фракций, включая осадок (7,5% сахарозы – фракции №1 и 2; 15% сахарозы – №3; 30% – №4, 5, 6; 60% сахарозы – 7, 8 и осадок - № 9).

Результаты исследования в ИФА, представленные на рисунке 4, которые свидетельствуют о том, что наиболее высокая активность антигенов *M. tuberculosis* проявляется во фракциях № 5, 6 и 7, тогда как наибольшая специфичность проявляется антигенным материалом из фракций 1, 2, 3 и 4. Низкие значения ОП в ИФА в последних перечисленных образцах связаны с низкой концентрацией материала, содержащегося в них.

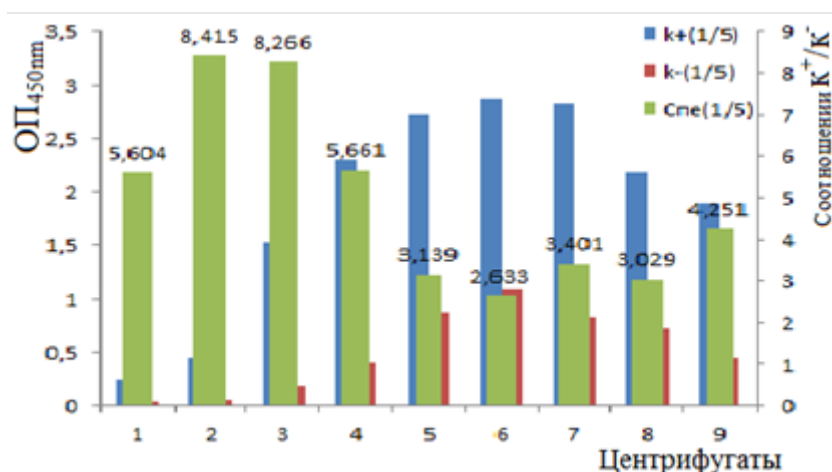


Рис. 4. Показатели ОП в ИФА фракций ФКС, полученных в результате ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы.

Белковый спектр фракций представлен на рис. 5. Видно что, в пробах преобладают белки с достаточно высокой молекулярной массой – более 29 кДа. Некоторые из этих белковых фракций не обнаруживаются на электрофореграмме исходного ФКС (рис. 5, трек 10) Таковыми являются антигены с м. м. 180 кДа, 105,8 кДа и 70 кДа.

Большой интерес представляют, на наш взгляд, антигены, присутствующие во фракциях с низким содержанием сахарозы: 7,5%, 15% и самые верхние фракции. Из-за низкой концентрации содержащегося в нем материала он не был выявлен на электрофореграммах, но по данным ИФА эти фракции содержат наиболее специфичный антигенный материал ИФА.

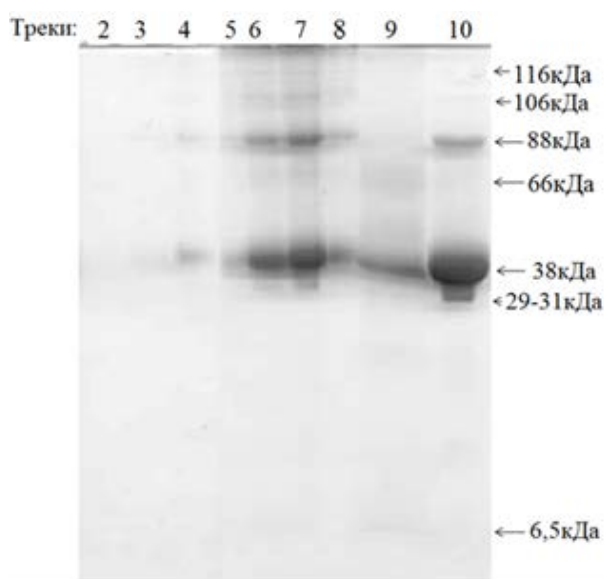


Рис. 5. Электрофорез в ПАГ различных фракций ФСК *M. tuberculosis*, полученных ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Фракции: 2) в 7,5% сахарозе; 3) в 15% сахарозе; 4) в 30% сахарозе, верхняя часть; 5) в 30 % сахарозе, средняя часть; 6) в 30% сахарозе, нижняя часть; 7) в 60% сахарозе, верхняя часть; 8) в 60% сахарозе; 9) осадок со дна пробирки; 10) исходный ФКС.

Таким образом, метод ультрацентрифугирования позволяет выделить из ФСК материал с более высоким содержанием специфических антигенов *M. tuberculosis*, чем они представлены в исходном ФКС.

Анализ белковых спектров различных видов микобактерий

Количество исследованных в серологических реакциях антигенов *M. tuberculosis* достаточно велико и насчитывает не один десяток. В частности, ряд авторов приводят список из 34 антигенов. [Suman. *et al*, 1997; Wang *et. al*, 2005]. По данным некоторых исследователей наиболее интересными являются антигены с м. м. 88 кДа, 45-47 кДа, 38 кДа, 29-31 кДа, 16 кДа, 14 кДа и 6,5 кДа.

В связи с этим было интересно изучить наличие содержания указанных белков в клетках различных видах микобактерий. На рис. 6 представлены электрофореграммы полных клеточных лизатов ряда микобактерий, некоторые из них являются этиологическими агентами туберкулеза. Видно, что различия в балансе белков достаточно значительные. Особенно они заметны в количестве мажорных фракций. У *M. tuberculosis* их четыре: с м.м. 120 кДа, 90 кДа, 55 кДа и 45 кДа, тогда как *M. bovis* имеет одну мажорную фракцию с м.м. 55 кДа, а *M. intracellulare*, *M. avium* – также по одной мажорной фракции, но с м.м. 45 кДа. Спектры белка этих микобактерий, в том числе и *M. bovis*, достаточно сильно отличаются от спектра белков вакцины БЦЖ тем, что вакцинный штамм *M. bovis* имеет значительно большее количество низкомолекулярных белков. Обращает внимание большое содержание белка с м.м. 45 кДа у *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. avium* и малое его количество у *M. bovis* и в вакцине БЦЖ.

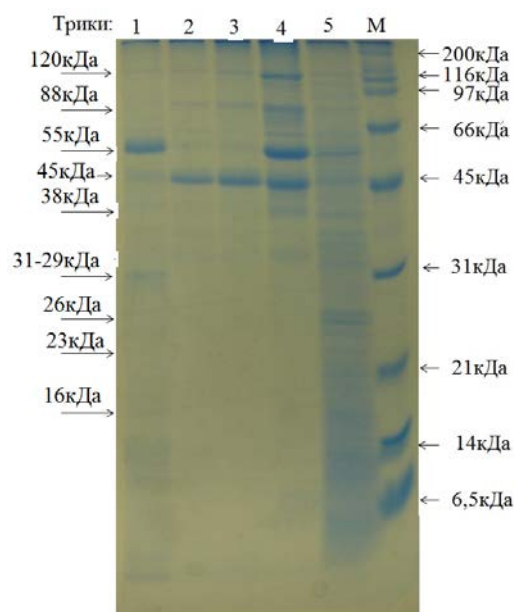


Рис. 6. Электрофоретические профили полных клеточных лизатов: 1) *M. bovis*, 2) *M. intracellulare*, 3) *M. avium*, 4) *M. tuberculosis*, 5) вакцина БЦЖ, М–набор белков «Prestained SDS-PAGE Standarts High Range».

Получение антигена *M. tuberculosis* с молекулярной массой 45 Да

В ряде исследований по изучению антигенов *M. tuberculosis* указывается на диагностическую ценность антигена с молекулярной массой 45 кДа [Diagbouga *et al*, 1997 and Roman F. *et al*, 1999]. В ФКС видимых количеств этого антигена нами не было выявлено. Ниже мы приводим описания схемы выделения данного антигена из клеток *M. tuberculosis*.

Выращенные в среде Сотона клетки *M. tuberculosis* осаждали центрифугированием в течение 30 минут при 8000 об/мин. и трижды промывали физиологическим раствором, рН 7,4 с последующим центрифугированием. Бактериальные клетки суспендировали в равном объеме 10% водного раствора диметилсульфоксида (ДМСО) и в течение 30 минут гомогенизировали. Гомогенат подвергали исчерпывающему диализу против дистиллированной воды, а затем против 0,05 М Трис-НСl буфера со значением рН 7,4-7,6. Центрифугированием в течение 30 минут при 8000 об/мин освобождались от клеток. Полученный ДМСО-экстракт служил исходным материалом для получения антигенного препарата с молекулярной массой 45 кДа. От балластного материала освобождались, варьируя

значениями pH антигенсодержащего раствора, методы высаливания и осаждения органическими растворителями, а также метод гель-фильтрации на сефадексе G-200. Контроль за ходом очистки проводили, используя метод электрофореза.

На рисунке 7 представлены иммуноблоты, которые были получены на промежуточных продуктах очистки антигена. Видно, что первые продукты очистки ДМСО-экстракта, которые представляли осадок, выпавший при значении pH 4,0, и супернатант содержат значительное количество серологически активных фракций (рис. 7, а1 и б1, соответственно).

Наибольшая вариабельность по серологической активности, проявляемой с сыворотками 4 больных туберкулезом, наблюдается на белковых фракциях, имеющих молекулярные массы: 11 кДа, 13,5 кДа, 15,5 кДа, 22 кДа, 24,5 кДа, 30 кДа и 53 кДа. Что касается фракции с молекулярной массой в 45 кДа, то на нее приходится лишь незначительная доля общей серопозитивности.

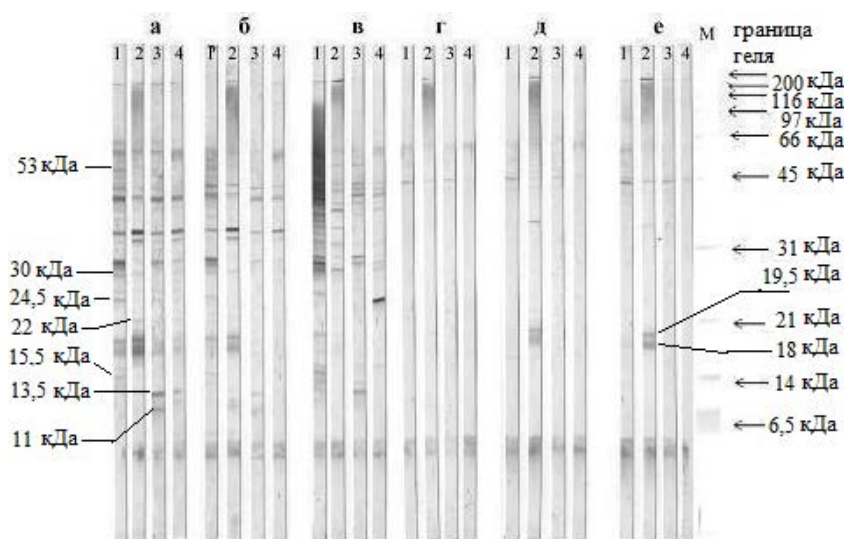


Рис. 7. Иммуноблоты, полученные на промежуточных продуктах очистки ДМСО-экстракта в реакциях с сыворотками 4 пациентов, больных туберкулезом легких: а) осадок, выпавший при значении pH 4,0; б) супернатант (№1), полученный после удаления выше упомянутого осадка; в) осадок, выпавший из супернатанта (№1) в присутствии 30% этанола; г) осадок, полученный из этанольного супернатанта (№2) при pH 4,0; д) осадок,

полученный из 3-го супернатанта после добавления 70% этанола; е) сульфат-аммоний осадок, полученный из 3-го супернатанта.

Последовательное снижение количества серологически незначимых фракций белков демонстрируют препараты, полученные на следующих этапах очистки: с использованием 30% этанола (рис. 7в), повторного отделения осадка при значении pH 4,0 (рис.7г), а также повторного осаждения 70% этанолом (рис.7д) и сульфатом аммония (рис.7е).

Сульфат-аммонийный осадок имел практически такой же набор серопозитивных фракций, как и осадок, образовавшийся в 70% этаноле и осадок, выпавший при pH 4,0 из второго супернатанта (рис.7г). Ввиду своеобразного распределения серологически активных фракций, которые в основном располагались в области молекулярных масс более 45 кДа и менее 21 кДа, для дальнейшей очистки использовали метод гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию сульфат-аммонийного осадка проводили на колонке с сефадексом G-200. Материал элюировался двумя пиками.

На рисунке 8 представлены иммуноблоты, полученные с антигенным материалом первого пика с 24 сыворотками больных туберкулезом легких. Видно, что на всех иммуноблотах весьма четко представлена серопозитивная фракция с молекулярной массой в 45 кДа. Следует в тоже время отметить, что сыворотки 3 пациентов (№ 2, №12 и №20) достаточно активно среагировали с наиболее медленно мигрирующей фракцией, которая не обнаруживается на электрофореграмме при использовании красителя Кумасси ярко-голубой G-250. Мы полагаем, что указанная фракция не приведет к сколько-нибудь существенному снижению чувствительности в реакции иммуноблотинга.

Представленные результаты дают основание полагать, что на полученном антигене 45 кДа проявляется 100% чувствительность. Однако по данным литературным известно, что в 100% случаях противотуберкулезные антитела выявляются только при фиброзно-кавернозном туберкулезе и при бактериовыделении [Waters *et al*, 2004]. Во всех остальных формах туберкулеза процент выявляемости ПТАТ был ниже. Мы не исключаем, что

проявление столь высокой чувствительности связано с тем, что все использованные в иммуноблотинге сыворотки имели высокий показатель оптической плотности в ИФА (более 2,0 оптических единиц).

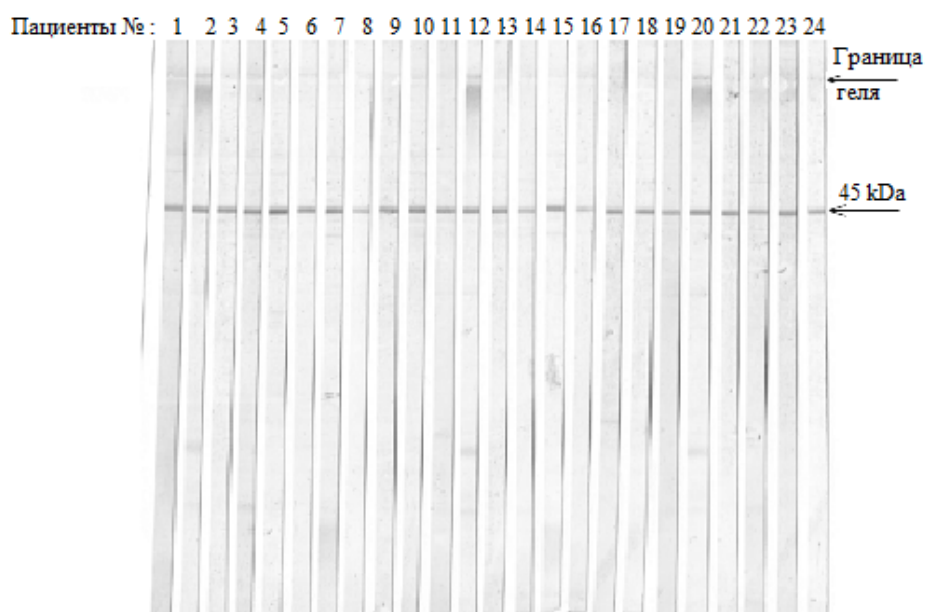


Рис. 9. Иммуноблоты антигенного комплекса полученного после гель фильтрации на сефадексе G-200 с 24 сыворотками больных туберкулезом.

Таким образом, в результате проведенной работы из клеток *M. tuberculosis* был получен антиген с молекулярной массой в 45 кДа, который содержит незначительное количество балластных белков. Предположительно этот антиген представляет собой гликопротеин, локализованный на поверхности бактериальной клетки. Данное предположение основывается на щадящем приеме обработки бактериальных клеток и на сходстве молекулярных масс антигенного комплекса 45-47 кДа, описанного в статьях [Diagbouga *et al*, 1997 and Roman *et al*, 1999].

ВЫВОДЫ

1. Фильтрат культурального супернатанта *Mycobacterium tuberculosis* штамма «Академия» содержит антигены с молекулярными массами 38 кДа, 31 кДа, 29 кДа и 6,5 кДа, которые проявляют серологическую активность с сыворотками больных легочной формой туберкулеза.

2. Осаждение белков из фильтрата культурального супернатанта *Mycobacterium tuberculosis* равным объемом этанола приводит к образованию осадка, содержащего основную долю серологически активного материала.

3. Ультрацентрифугирование фильтрата культурального супернатанта *Mycobacterium tuberculosis* в ступенчатом градиенте сахарозы позволяет получить антигенсодержащий материал, по специфичности превосходящий исходный супернатант.

4. Белок с м.м. 45 кДа в большом количестве представлен в спектрах основных возбудителей туберкулеза человека – *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* и *M. avium* и содержится в следовых количествах в спектрах белков *M. bovis* и вакцинного штамма БЦЖ. Это позволит использовать данный антиген в качестве компонента тест–системы, выявляющей антитела в сыворотке крови людей, инфицированных патогенными микобактериями, а также исключить из круга подозреваемых пациентов, вакцинированных БЦЖ.

5. Обработка клеток *M. tuberculosis* 10% водным раствором ДМСО с последующим фракционированием супернатанта при изменении pH, осаждением этанолом и сульфатом аммония, гель-фильтрации на колонке с сефадексом G–200 позволяют получить антигенный препарат, содержащий одну серопозитивную фракцию с молекулярной массой в 45 кДа

ПУБЛИКАЦИИ

1. Алфредо Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* / Э. Алфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов, С.В. Герасимова, Н.Г. Уразов, И.М. Хаертынова // **Журнал фундаментальные исследования.**– 2013. – No.1.– С.18-22 (список ВАК-авт.0,15 п.л.)
2. Алфредо Э. Антиген для иммунологических анализов. / Э. Алфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов, С.В. Герасимова, Н.Г. Уразов, Р. Х. Равилов // **Ученые записки КГВАМ.** –2012.–Том.219 – С. 252-257. (список ВАК-авт.0,15 п.л.)
3. Алфредо Э. Фракционирование антигенов *Mycobacterium tuberculosis* присутствующих в культуральной среде методом ультрацентрифугирования. / Э. Алфредо, В.И. Вершинина, Н.Г. Уразов // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых-ЛОМОНОСОВ. 9-13 апреля – 2012.– С.165.
4. Алфредо Э. Изучения гуморального иммунного ответа у больных туберкулезом в реакции иммуноблотинга с использованием комбинации антигенов, полученных из микобактерий нескольких видов. / Э. Алфредо, К.С. Хаертынов, И.М. Хаертынова, Н. Г. Уразов, Т.Р. Якупов // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнология. Материалы III Международной интернет - конференции. Казань 19-22-ноябре. –2012.– С. 24-25.
5. I.M. Khaertynova. Influence of glycosylation mycobacterial proteins in molecular weight 10-20 kDa on serological activity at various forms of tuberculosis. / I.M. Khaertynova, A. P. Tsibulkin, R.SH. Valiev, S.V. Gerasimova, K.S. Khaertynov, **H. Alfredo** // New concepts on mechanisms of inflammation, autoimmunity and tumorigenesis. The IIIrd international meeting. KSMU.-2012. – P.101-106.

Email:helderjr80@yahoo.com